

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**ENANTIOSEPARACE A DERIVATIZACE
VYBRANÉ AMINOKYSELINY**

**ENANTIOSEPARATION AND DERIVATIZATION OF
SELECTED AMINO ACID**

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Nela Rozumová

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Doc. RNDr. Zuzany Bosákové CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

.....
podpis

Chtěla bych poděkovat mé školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za cenné rady, starostlivé vedení, vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratoři analytické chemie a za pomoc při zpracování výsledků.

Největší dík patří mé rodině, která mě během celého studia podporovala.

OBSAH

<u>1. ÚVOD</u>	8
<u>2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY</u>	9
<u>2.1 AMINOKYSELINY</u>	9
<u>2.2 ENANTIOMERY</u>	12
<u>2.3 CHIRÁLNÍ SEPARACE</u>	13
2.3.1 PŘÍMÁ CHIRÁLNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE	13
2.3.1.1 CHIRÁLNÍ STACIONÁRNÍ FÁZE	14
2.3.1.2 TEIKOPLANIN (CHIROBIOTIC T)	14
<u>2.4 DERIVATIZACE</u>	16
2.4.1 DERIVATIZACE AMINOKYSELIN POMOCÍ CHIRÁLNÍCH DERIVATIZAČNÍCH ČINIDEL	16
2.4.1.1 CHIRÁLNÍ DERIVATIZAČNÍ ČINIDLA	17
<u>2.5 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE</u>	19
2.5.1 MOBILNÍ FÁZE V HPLC	19
2.5.2 DETEKCE	19
2.5.3 PRINCIP SEPARACE LÁTEK	20
<u>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</u>	22
<u>3.1 CHEMIKÁLIE</u>	22
<u>3.2 PŘÍSTROJE</u>	22
<u>4. VÝSLEDKY A DISKUSE</u>	23
<u>4.1 SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE PRO ENANTIOSEPARACI NEDERIVATIZOVANÉHO D,L-VALINU</u>	23
<u>4.2 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST</u>	25
<u>4.3 MEZ STANOVITELNOSTI A MEZ DETEKCE</u>	27
<u>4.4 SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE PRO ENANTIOSEPARACI DERIVATIZOVANÉHO D,L-VALINU</u>	28
<u>4.5 KALIBRAČNÍ ZÁVISLOST</u>	33
<u>4.6 MEZ STANOVITELNOSTI A MEZ DETEKCE</u>	35
<u>5. ZÁVĚR</u>	37
<u>6. PŘEHLED LITERATURY</u>	38

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

Zkratky:

ACN	<i>acetonitril</i>
ALA	<i>alanin</i>
AMK	<i>aminokyseliny</i>
C18	<i>uhlovodíkový řetězec, obsahující osmnáct chirálních atomů uhlíku</i>
CDR	<i>chirální derivatizační činidlo</i>
CSP	<i>chirální stacionární fáze</i>
DCT	<i>dichlor-s-triazin</i>
FDNP	<i>fluordinitrofenyl</i>
FMOC-Cl	<i>9-fluorenylmethylchlormravenčan</i>
HAc	<i>octová kyselina</i>
HPLC	<i>vysokoúčinná kapalinová chromatografie</i>
IBC	<i>N-isobutyryl-L-cystein</i>
LEU	<i>leucin</i>
LOD	<i>mez detekce</i>
LOQ	<i>mez stanovitelnosti</i>
MCT	<i>monochlor-s-triazin</i>
ME	<i>merkapt ethanol</i>
MeOH	<i>methanol</i>
NAc	<i>N-acetyl-L-cystein</i>
OPA	<i>o-ftalaldehyd, o-ftalaldialdehyd</i>
PDA	<i>o-fenylendiamin</i>
PHE	<i>fenylalanin</i>
PHES	<i>fenylisothiokyanát</i>
R-NMC	<i>N-(R)-mandelyl-L-cystein</i>
RP-HPLC	<i>vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází</i>
TEAA	<i>triethylamin octanový pufr</i>
TFA	<i>trifluor octová kyselina</i>
VAL	<i>valin</i>

Symbols:

$\alpha_{1/2}$	<i>selektivita</i>
A	<i>plocha píku</i>
c	<i>koncentrace</i>
F_m	<i>objemová rychlost toku</i>
h	<i>výška píku</i>
H	<i>výškový ekvivalent teoretického patra</i>
k	<i>retenční faktor</i>
K_1, K_2	<i>disociační konstanty</i>
L	<i>délka kolony</i>
n	<i>počet teoretických pater</i>
Q	<i>průtok</i>
R	<i>rozlišení píku</i>
R^2	<i>koeficient determinace</i>
t_m	<i>mrtvý čas kolony</i>
t_r	<i>retenční (eluční) čas</i>
t_r'	<i>redukovaný retenční čas</i>
V_m	<i>mrtvý objem kolony</i>
V_r	<i>retenční (eluční) objem</i>
(v/v)	<i>objemová procenta</i>
λ	<i>vlnová délka</i>

ABSTRAKT

Enantioseparace nativní i derivatizované formy D,L-valinu byla studována s využitím chirální stacionární fáze, založené na bázi teikoplaninového chirálního selektoru. Pro enantioseparaci a kvantifikaci nederivatizovaného D,L-valinu byla nejvhodnější mobilní fáze methanol/voda 50/50 (v/v) a UV detekce při 205 nm. Byly určeny hodnoty LOD a LOQ pro L- a D-enantiomery, řádově v setinách mg/ml. Derivatizace D,L-valinu byla provedena pomocí 9-fluorenylmethylchlormravenčanu (FMOC-Cl). Optimalizovaná mobilní fáze pro enantioseparaci FMOC-D,L-valinu byla 37/63 (v/v) methanol/0,5% triethylaminooctanový pufr, pH 4,0. S fluorescenční detekcí při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm byla provedena kvantifikace a hodnoty LOD a LOQ pro FMOC-L- a FMOC-D-valin se pohybovaly v řádu setin až desetin $\mu\text{g/ml}$. Výsledky ukazují, že po derivatizaci bylo dosaženo mnohem vyšší citlivosti detekce.

Klíčová slova: HPLC chirální separace, aminokyselina, derivatizace, FMOC-Cl

ABSTRACT

The enantioseparation of native and derivatized form of D,L-valine was studied on chiral stationary phase, based on teicoplanin chiral selector. The most suitable mobile phase for the enantioseparation and quantification of underivatized D,L-valine was methanol/water 50/50 (v/v) and UV detection at 205 nm. LOD and LOQ for L- and D-enantiomers were evaluated, in order of hundredths of mg/ml. Derivatization of D,L-valine was done using 9-fluorenylmethylchloroformate (FMOC-Cl). For the enantioseparation of FMOC-D,L-valine the optimized mobile phase consisted of 37/63 (v/v) methanol/0,5% triethylamine acetate buffer (TEEA), pH 4,0. Quantification was carried out using fluorescence detection at the excitation wavelength of 254 nm and the emission wavelength of 314 nm. LOD and LOQ values for FMOC-L- and FMOC-D-valine were in the range from hundredths to tenths of $\mu\text{g/ml}$. The results show that much higher detection sensitivity was achieved after the derivatization procedure.

Key words: HPLC chiral separation, amino acid, derivatization, FMOC-Cl

1. ÚVOD

V posledních dvaceti letech narůstá zájem o chirální separace opticky aktivních látek, zejména léčiv a pesticidů. Nověji se zájem soustřeďuje i na enantioseparace složek potravin a potravinového řetězce.¹ Mezi nejdůležitější chirální látky patří aminokyseliny. Plní nejen funkci základních stavebních jednotek živých organismů, ale jsou i důležitým prekurzorem pro syntézu řady léčiv a v poslední době se staly i populárními výživovými doplňky užívanými zejména sportovci. V souvislosti s tím vstupuje do popředí vyvíjení nových analytických postupů, které by byly schopné oddělit jednotlivé enantiomery, přítomné v různých matricích, s dostatečným rozlišením a v krátké době analýzy. Řada aminokyselin ve své molekule neobsahuje chromofory a tudíž je jejich UV detekce obtížná a dosažená citlivost detekce nízká. Pro zvýšení detekce je nutné tyto aminokyseliny derivatizovat.

Tato práce je zaměřena na vývoj HPLC metody pro enantioseparaci D,L-valinu v nativní i derivatizované formě za využití chirální stacionární fáze založené na bázi glykopeptidu - teikoplaninu. Derivatizace je realizována fluorescenčním derivatizačním činidlem (9-fluorenylmethylchlormravenčan) a součástí práce je i porovnání dosažených hodnot limitů detekce a kvantifikace, získaných pro nederivatizovaný i derivatizovaný D,L-valin.

2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

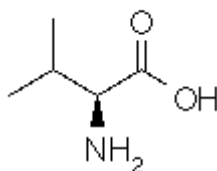
2.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny (AMK) (př.: viz obr. 1) jsou stavební jednotky mnoha sloučenin, které jsou navzájem spojeny kovalentně tzv. peptidovou vazbou ($-\text{CO}-\text{NH}-$), díky níž jsou vytvářeny peptidy a proteiny. Každý peptid má na jednom konci aminoskupinu a na druhém karboxylovou skupinu, což mu dodává strukturní polaritu. Proteiny a peptidy jsou nejdůležitější složky živého systému. Všechny běžné AMK, kromě glycinu, mají chirální atom uhlíku sousedící s karboxylovou skupinou a mohou existovat i jako optické izomery, ve formách D a L. AMK můžeme rozdělit podle výskytu na - proteinogenní a neproteinogenní.² V proteinech byly nalezeny pouze L-formy, substituce na α -uhlíku je asymetrická. Toto chirální centrum umožňuje existenci dvojice enantiomerů.^{2,3}

Vedle základních funkčních skupin (karboxylové a aminové) má každá aminokyselina charakteristický postranní alifatický nebo aromatický zbytek, jímž se jednotlivé aminokyseliny liší a který rozhoduje o interakcích a funkcích peptidů a proteinů.

Dělení aminokyselin podle struktury postranního řetězce (R-substituent):

- 1) aminokyseliny s nepolárním -R: glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, methionin, prolin, fenylalanin, tryptofan
- 2) aminokyseliny s polárním -R: serin, threonin, asparagin, glutamin, tyrosin, cystein
- 3) kyselé aminokyseliny s nabitým -R: asparagová kyselina, glutamová kyselina
- 4) bazické aminokyseliny s nabitým -R: lysin, arginin, histidin

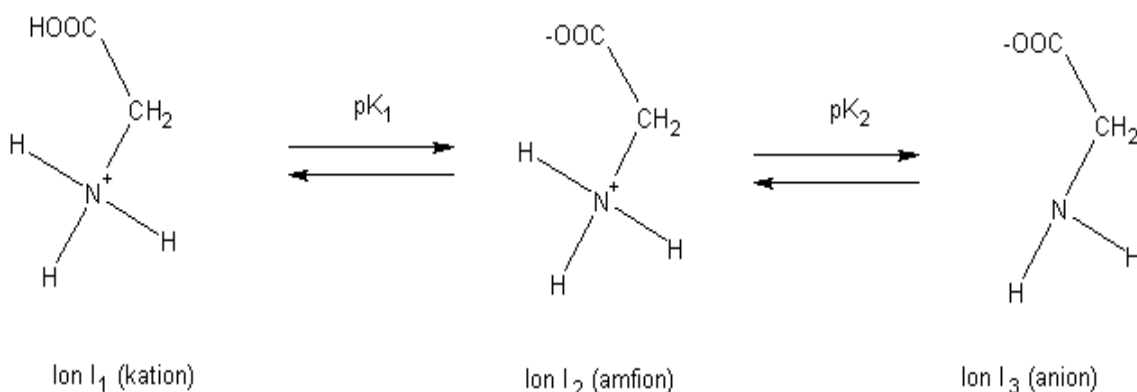


val v Valin

Obr.1 Vzorec vybrané a v této práci studované L- aminokyseliny

(převzato z: <http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/bio/aminoacid/>)

Aminokyseliny jsou amfolyty, tedy látky, které se chovají jako kyseliny i zásady (viz obr. 2). Vyskytují se ve formě vnitřních solí. Z iontového charakteru vyplývá závislost jejich struktury na pH.



Obr. 2 Iontové formy aminokyselin

(převzato z: http://hplc1.sweb.cz/Amk/isoelektricky_bod.htm)

Karboxylová skupina je schopna odštěpovat ionty H^+ (I_3), aminoskupina je schopna je přijímat za vzniku amoniových solí (I_1), jsou-li disociovány obě skupiny, dostáváme obojetné ionty. Tato elektroneutrální molekula vnitřní soli se nazývá izoelektrická a existuje pouze při určitém pH, které se označuje jako izoelektrický bod (I_2).

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

kde K_1 a K_2 jsou disociační konstanty.

V isoelektrickém bodě pI je pH , při kterém nemá aminokyselina žádný výsledný náboj a tudíž se v elektrickém poli stejnosměrného proudu nepohybuje.

Kromě své hlavní úlohy, stavebních jednotek bílkovin, mají aminokyseliny ještě další významné metabolické funkce. Jsou především výchozími látkami pro syntézu biologicky aktivních látek nebílkovinného charakteru, např. vznik alkaloidů, flavonoidů, některých vitamínů a mnoho z nich je nezbytnou složkou potravy.^{2,4,5}

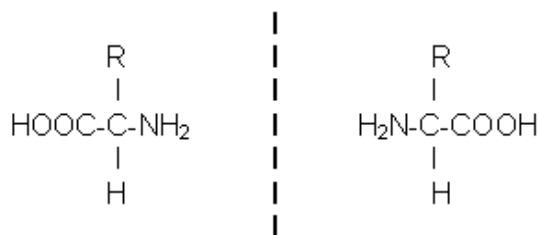
AMK jsou jedněmi ze základních chirálních sloučenin ve farmaceutickém a biochemickém průmyslu a fungují jako důležité chirální stavební bloky.⁶

2.2 ENANTIOMERY

Prostorové uspořádání molekul se nazývá stereochemie. Stereoizomery mají odlišnou konfiguraci, tzn. že mají různé prostorové uspořádání atomů či skupin, ale shodnou strukturu. Rozlišujeme dva druhy těchto molekul - symetrické a asymetrické.

Mezi asymetrické molekuly patří optické izomery. Pokud míra otáčení polarizovatelného světla není stejná, jde o diastereoizomery, jestliže oba izomery otáčí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel, ale v opačném smyslu, jde o enantiomery. Nazýváme je také levotočivé a pravotočivé optické antipody. Směs enantiomerů 1:1, která má nulovou optickou aktivitu, nazýváme racemát. Tyto optické izomery mají stejnou konstituci a jejich vzájemný vztah je ztotožnitelný se vztahem pravé a levé ruky - jsou si navzájem zrcadlovými obrazy (viz obr. 3). Chirální objekty tedy nejsou ztotožnitelné se svým zrcadlovým obrazem a neobsahují reflexní prvky symetrie.

Nejčastějším zdrojem chiralit je uhlík (chirální uhlík) nesoucí čtyři různé substituenty.



Obr. 3 Zrcadlové obrazy

(převzato z : www.natur.cuni.cz/www/data/ak.../ena.gif)

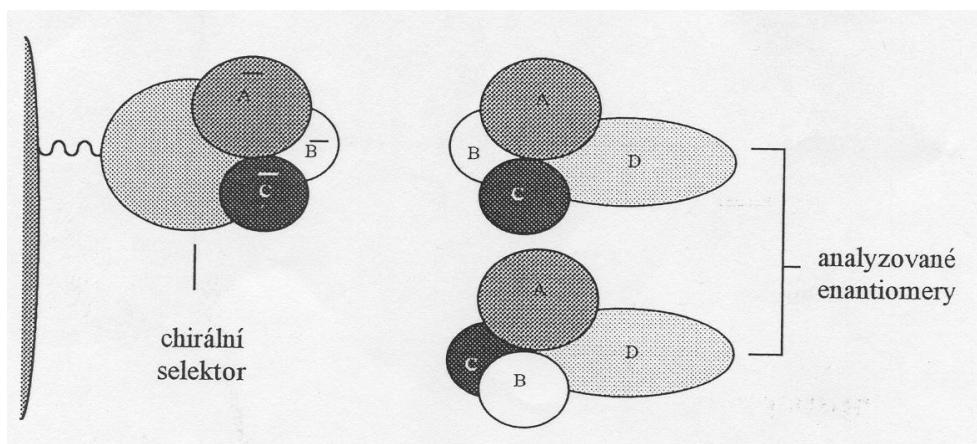
Dvojice enantiomerů má téměř identické fyzikálně-chemické vlastnosti, např.: reaktivitu, rozpustnost, body tání či varu, avšak fyziologické a biologické vlastnosti se mohou lišit.⁷

2.3 CHIRÁLNÍ SEPARACE

Separace enantiomerů je označována jako chirální separace. Tu lze provést dvojím způsobem. V případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) jsou při přímé metodě látky separovány bez předchozí chirální derivatizace za pomoci buď chirální stacionární fáze (CSP), nebo s přidavkem chirálního činidla do mobilní fáze. Daleko časteji jsou však využívány CSP. Na inertním nosiči je navázána opticky aktivní látka tzv. chirální selektor. Během chirální separace se vytvoří přechodné diastereoizomerní komplexy mezi chirálním selektorem a dělenými enantiomery. V metodě nepřímé se používá nechirální stacionární fáze a vlastní separaci předchází derivatizační reakce mezi racemickým analytem a opticky čistým činidlem. Nevýhodou nepřímé metody je, že vzniká stabilní diastereoizomerní pár a tento způsob je nevýhodný např. pro izolaci jednotlivých enantiomerů.⁸

2.3.1 Přímá chirální kapalinová chromatografie

Mezi výhody přímé metody, jak již bylo zmíněno, patří separace látek bez chirální předúpravy, metoda je rychlá a poměr enantiomerů se určuje pomocí ploch příslušných píků. Nevýhodou je vysoká cena chirální stacionární fáze a možnost racemizace při separačním procesu. Většina modelů chirálního rozpoznávání je založena na teorii tzv. třítodové interakce, což znamená, že pro chirální interakci analytu s chirálním selektorem je nutné současné působení třech interakcí (viz obr. 4).



Obr. 4 Model třítodové interakce⁹

2.3.1.1 Chirální stacionární fáze

Chirální stacionární fáze jsou realizovány navázáním příslušného chirálního selektoru (enantiomeru) na nosič, tím bývá nejčastěji silikagel. V poslední době jsou k dispozici i CSP s nosičem na bázi oxidu zirkoničitého. Přítomnost chirálního selektoru může být realizována pouhým pokrytím (fyzikální sorpcí) nosiče chirálním selektorem. Nevýhodou takto pokrytých chirálních stacionárních fází je jejich omezená teplotní stabilita, omezený rozsah použitelných organických rozpouštědel a nižší životnost. Výhodou je vyšší počet možných interakčních míst, neblokovaných vazbou chirálního selektoru k nosiči. Jako chirální selektory byla využita celá řada opticky aktivních látek, k nejčastěji využívaným patří deriváty celulosy a amylosy, deriváty cyklodextrinů, řada proteinů a makrocyclická antibiotika, konkrétně glykopeptidy. Mezi glykopeptidové chirální selektory patří vankomycin, teikoplanin, ristocetin A a avoparcin, přičemž vankomycin, teikoplanin a jejich analogy jsou používány nejčastěji.

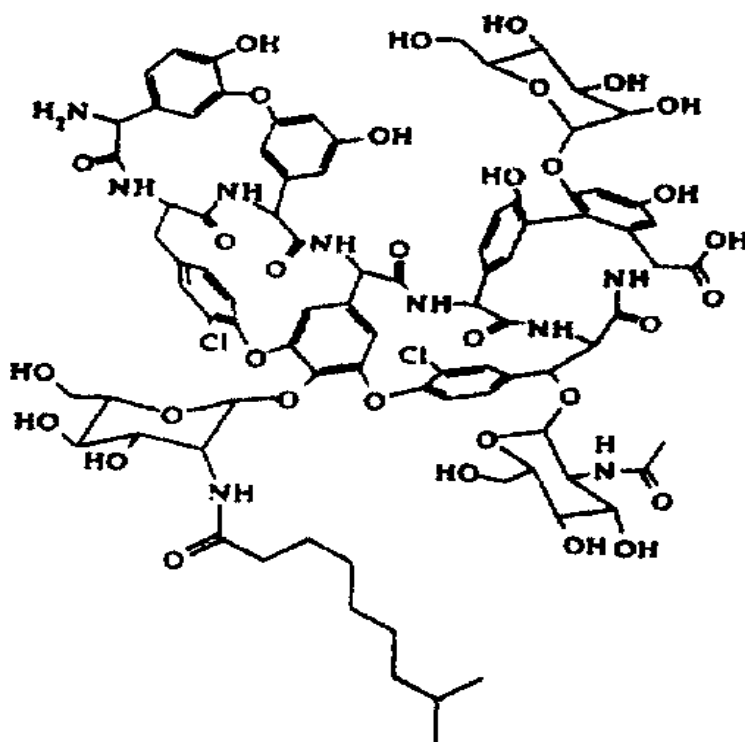
2.3.1.2 Teikoplanin (Chirobiotic T)

Teikoplanin (viz obr. 5) je složen ze čtyř makrocyclických kruhů, ke kterým jsou připojeny tři monosacharidové jednotky D-manosy a dva D-glukosaminy. Jako jediný z glykopeptidových chirálních selektorů má hydrofobní řetězec připojený ke 2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosylovému zbytku. Obsahuje dvacet tři chirálních center. Díky množství funkčních skupin umožňuje enantioseparaci řady chirálních sloučenin a vykazuje vysokou selektivitu zejména pro nederivatizované, ale i derivatizované AMK. V interakčním mechanismu se uplatňují zejména vodíková vazba, elektrostatické a π - π interakce.^{9,10,11}

CSP na bázi teikoplaninu mohou pracovat ve třech základních separačních módech. Iontově-polární mód je vhodný pro všechny molekuly, které obsahují alespoň dvě funkční skupiny, nejlépe v blízkosti chirálního centra, přičemž nejméně jedna z funkčních skupin musí být disociovatelná. V iontově-polárním módu je nejvýhodnější výchozí mobilní fáze složená z methanolu nebo acetonitrilu s malými přídávky octové kyseliny a triethylaminu řádově v setinách až desetinách objemových procent.

Základem reverzního módu je mobilní fáze obsahující organický modifikátor v kombinaci s vodou nebo vodným roztokem pufru. Důležitým nástrojem pro změnu selektivity je obsah a typ organického modifikátoru (methanol, acetonitril, propan-2-ol, aj.) a hodnota pH vodné složky. Normální separační mód, který upřednostňuje vodíkovou vazbu, je realizován mobilní fází tvořenou kombinací nepolárního a polárního rozpouštědla.

Dostupné jsou také CSP s vázaným teikoplanin-aglykonem, který má osm chirálních center a neobsahuje cukerné složky.¹²



Obr.5 Strukturní vzorec teikoplaninu¹³

2.4 DERIVATIZACE

Derivatizací obecně rozumíme proces, při kterém měníme fyzikální a chemické vlastnosti analytu. Z praktických důvodů se derivatizace používá pro:

- zvýšení rozlišení nebo umožnění chirální separace
- lepší detekovatelnost (zvýšení citlivosti)
- větší stabilitu analytu
- zlepšení chromatografických vlastností

Za nevýhodu lze považovat to, že při derivatizaci je nutno přidat krok navíc, tzn. že se může zvýšit chyba analýzy i celková doba trvání. Derivatizační reakce by měla mít minimum vedlejších produktů, měla by být rychlá a proběhnout kvantitativně.

Podle časového zařazení rozlišujeme derivatizaci předkolonovou (probíhá před kolonou), postkolonovou (probíhá za kolonou) a derivatizaci přímo v koloně.^{9,14}

2.4.1 Derivatizace aminokyselin pomocí chirálních derivatizačních činidel

Pro aminokyseliny je v literatuře publikována řada derivatizačních postupů, zahrnujících jak chirální, tak nechirální způsob derivatizace. Vzhledem k zaměření této bakalářské práce jsou v následující kapitole uvedeny pouze derivatizace pomocí chirálních derivatizačních činidel.

Volba vhodné metody pro analýzu látek je velmi důležitá. Pro stanovení derivatizovaných AMK převažuje metodika kapalinové chromatografie a elektroforézy.

2.4.1.1 Chirální derivatizační činidla (CDR)

Sangerovo činidlo (4 varianty fluordinitrofenylu (FDNP-L-Ala, FDNP-L-Val, FDNP-L-Phe, FDNP-L-Leu)) bylo použito pro derivatizaci a následnou separaci osmnácti proteinogenních AMK a osmi neproteinogenních AMK pomocí HPLC na koloně C18 s mobilní fází, tvořenou vodným roztokem trifluoroctové kyseliny (TFA) a acetonitrilem (ACN) s UV detekcí při 340 nm. Mezi úspěšné varianty Sangerova činidla patří Marfeyho činidlo (1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alaninamid (FDNP-L-Ala-NH₂)), kde je atom fluoru nahrazen amidem aminokyseliny. Detekce probíhá při 340 nm. Tento způsob derivatizace umožnil rozlišení diastereoizomerních párů D,L-AMK, zahrnující kyselé, neutrální nebo aromatické zbytky. Výhodou jsou menší náklady na přípravu enantiomerů v laboratoři a vyšší výtěžek.¹⁴

Různě substituované monochlor- a dichlor-s- triaziny byly použity jako chirální derivatizační činidlo pro derivatizaci α -aminokyselin. Derivatizace pomocí dichlor-s-triazinů (DCT) byla provedena při pokojové teplotě (30 °C), zatímco derivatizace s monochlor-s-triazinem (MCT) při teplotě 80 °C. Výsledné diastereoizomery byly rozděleny na reverzní stacionární fázi C18 pomocí mobilní fáze se směsí trifluoroctové kyseliny (TFA) a acetonitrilu (ACN) s UV detekcí při 230 nm. Výsledky ukázaly, že ve většině případů byly DCT úspěšnější v rozlišení AMK a obecně i v separaci ve srovnání s MCT.¹⁵

Mezi další často užívaná derivatizační činidla patří látky obsahující síru (SH činidla), např. N-acetyl-L-cystein (NAC), N-(*R*)-mandelyl-L-cystein (R-NMC) spolu s o-ftalaldehydem (OPA). Derivatizace pomocí činidel OPA a chirálních thiolů a následná HPLC separace na koloně C18 je jednou z dobře známých metod efektivní analýzy AMK. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a fosfátového pufru o pH=6. Hlavním nedostatkem této metody je prakticky nemožná chirální analýza komplexních směsí. Kombinované použití SH činidel založených na bázi NMC a dalších činidel rozšiřuje možnosti této metody pro přesnější analýzu enantiomerů ve složité směsi AMK.¹⁶

Enzymaticky byly za pomoci o-fenylendiaminu (PDA) a 2-merkptoethanolu (2ME) selektivně stanoveny D-AMK. AMK je enzymaticky modifikována s monoaminoxidasou a následně separována pomocí HPLC po chemické modifikaci s PDA v přítomnosti 2ME.¹⁷

Derivatizace pomocí fenyliothiokyanátu (PHES) umožňuje separaci AMK na naftylethylkarbamát- β -cyklodextrinové CSP v mobilní fázi s ACN jako organickým modifikátorem. Výhodou této metody je, že nechává zbytek peptidického řetězce neporušený, takže analýza může být opakována. Další výhodou je dlouhá životnost kolony s mobilní fází tvořenou organickými rozpouštědly.¹⁸ Separace může probíhat i na teikoplaninové CSP.¹⁹

Pro fluorescenční detekci lze použít k derivatizaci AMK o-ftalaldialdehyd (OPA) a *N*-isobutyryl-D-cystein (IBC) a separovat za použití kolony RP18 s mobilní fází octan sodný/methanol. V porovnání s *N*-acetyl-L-cysteinem (NAC) poskytl IBC lepší výsledek. Mezi výhody patří snadná příprava vzorku a tím nižší možnost kontaminace.²⁰

(S)-TBMB karboxylová kyselina patří mezi fluorescenční derivatizační činidla, aplikovatelná pro analýzu enantiomerů AMK pomocí HPLC na koloně C18. V porovnání s činidlem OPA bylo dosaženo citlivější detekce.²¹

Další možností je derivatizace pomocí o-ftalaldialdehydu (OPA) s 1-thio- β -D-galaktosou, vhodnou pro derivatizaci řady aminokyselin. Problémy spojené s analýzou se zvyšují s klesající velikostí vzorku a jsou z velké části zapříčiněny i nečistotou OPA činidla.²²

Mezi derivatizační činidla reagující rychle s primárními AMK na velmi stabilní fluoreskující deriváty patří 9-fluorenylmethylchlormravenčan (FMOC-Cl). Používá se výhradně k předkolonové derivatizaci. Bylo prokázáno, že metodou pomocí derivatizace s FMOC lze oddělit a identifikovat i velmi hydrofilní peptidy. Nevýhodou je nestabilita produktu, kdy může dojít ke tvorbě více derivátů. Po navázání FMOC-Cl na aminokyselinu dojde k blokaci aminoskupiny.^{23,24}

2.5. HPLC (Vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, též někdy nazývána vysokotlaká kapalinová chromatografie, je jednou z nejpoužívanějších separačních technik v analytické chemii a je nejfrekventovanější metodou instrumentální analýzy. Používá se jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu látek. Hlavní výhodou HPLC je široké spektrum použití; pomocí této metody lze analyzovat až 80% všech známých sloučenin, které se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako je například polarita či těkavost. Další výhodou je možnost ovlivňování separace pomocí složení mobilní fáze. Nevýhodou je složitější mechanismus a náročnější instrumentace.

2.5.1 Mobilní fáze v HPLC

V kapalinové chromatografii se mobilní fáze významně podílí na separačním procesu, změna složení mobilní fáze je prakticky neomezená a je jednodušší než volba jiné stacionární fáze. Separaci však lze ovlivňovat i jinak a to pomocí pH, iontové síly nebo přidáním iontově-párových činidel. Mobilní fáze je charakterizována především polaritou a selektivitou.

Velmi důležitý je i charakter mobilní fáze z hlediska detekce. Mobilní fáze by měla poskytovat minimální signál v detektoru a musí umožňovat co nejcitlivější a nejreprodukovatelnější detekci solutů.^{8,25}

2.5.2 Detekce

Detekovány mohou být vlastnosti mobilní fáze (index lomu) nebo vlastnosti analytu (UV absorpce, fluorescence). Nejčastěji se používají detektory spektrofotometrické v UV a UV-VIS oblasti, které jsou vysoce univerzální avšak méně citlivé. UV detekce patří k nejčastěji používané detekci v HPLC. Fluorimetrický detektor je ve srovnání s UV detektorem až 1000 x citlivější. Pro zjištění detekce nefluoreskujících sloučenin je nutná jejich derivatizace.

2.5.3 Princip separace látek

Při separaci látek se v kapalinové chromatografii uplatňuje adsorpce, rozdělování mezi dvě nemísitelné fáze na základě různé rozpustnosti, iontové výměny, síťového efektu a biospecifické interakce (molekulové rozpoznání).

Separaci lze ovlivnit změnou průtokové rychlosti, teploty či změnou stacionární fáze neboli výměnou kolony. Dělení směsi tedy závisí na vlastnostech jak mobilní tak stacionární fáze.

Celkový čas, který stráví látka v koloně se nazývá retenční (eluční) čas t_r . Důležitou hodnotou je i mrtvý čas t_m , který odpovídá elučnímu času nezadržované látky. Čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi se nazývá redukovaný retenční čas t_r' .

Retenční charakteristiky solutů mohou být také vyjádřeny pomocí odpovídajících objemů mobilní fáze, které kolonou prošly.

$$V_r = t_r \cdot F_m,$$

kde V_r je retenční (eluční) objem a F_m je definována jako tzv. objemová rychlost toku, což je objem mobilní fáze proteklé kolonou za jednotku času.

Jednou ze základních charakteristik chromatografického systému je retenční faktor k definovaný vztahem:

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{V_r - V_m}{V_m},$$

kde V_m je mrtvý objem kolony.

K vyjádření účinnosti kolony byl zaveden počet teoretických pater n , kdy platí že:

$$n = \frac{L}{H},$$

kde L je celková délka kolony a H je výškový ekvivalent teoretického patra.

Hodnota rozlišení pro látky 1 a 2 je definována vztahem:

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2},$$

kde w je šířka eluční křivky při základně.

Kritériem pro separační schopnosti chromatografického systému je selektivita, která je pro látky 1 a 2 definovaná podle vztahu:

$$\alpha_{1/2} = \frac{k_2}{k_1},$$

System je selektivnější, čím je hodnota $\alpha_{1/2}$ vyšší.^{9,25,26}

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

Pro přípravu mobilní fáze byly použity tyto chemikálie: methanol CHROMASOL V UN 1230 (Sigma-Aldrich, Německo, 99,9 %), triethylamin (Sigma-Aldrich, Německo, 99,5%) a deionizovaná voda (Milli Q, Millipore, USA), k úpravě pH byla použita octová kyselina (Lachema a.s., Česká Republika, 99%). Pro derivatizaci byl užit 9-fluorenylmethylchlormravenčan (Sigma-Aldrich, Německo, 99,0%). Analyzovaným vzorkem byl D/L valin a L-valin (Sigma-Aldrich, Německo, 99%).

3.2 Přístroje

Měření bylo prováděno na kapalinovém chromatografu, který je složen z vysokotlaké pumpy (CRYSTAL 200, PYE UNICAM PU 4020, Velká Británie), UV detektoru (PYE UNICAM PU 4020, Velká Británie), fluorescenčního detektoru (SPECTRA System, spol. s.r.o, USA), HPLC Vacuum degaseru CSI6150, (Cambridge Scientific Instruments, Velká Británie) a dávkovače (Rheodyne, Cotati, USA) se smyčkou o objemu 20 μ l.

Dále byla používána kolona CHIROBIOTIC T D81-5C (250 x 4,6 mm I.D., velikost zrnění 5 μ m) – teikoplanin navázaný na silikagelu (Whippany, NJ, USA).

Vzorky byly naváženy na analytických vahách APX-100, (Denver Instrument, USA) a dávkovány injekční stříkačkou 25 μ l, Hamilton 702NR, (Švýcarsko) a pH bylo upraveno pomocí pH-metru 3510 (JENWAY, Velká Británie).

Grafy byly vyhodnocovány programem Origin 7.0 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft office Excel 2007(Microsoft, USA).

4. VÝSLEDKY, DISKUSE

4.1 Volba složení mobilní fáze pro enantioseparaci nederivatizovaného valinu

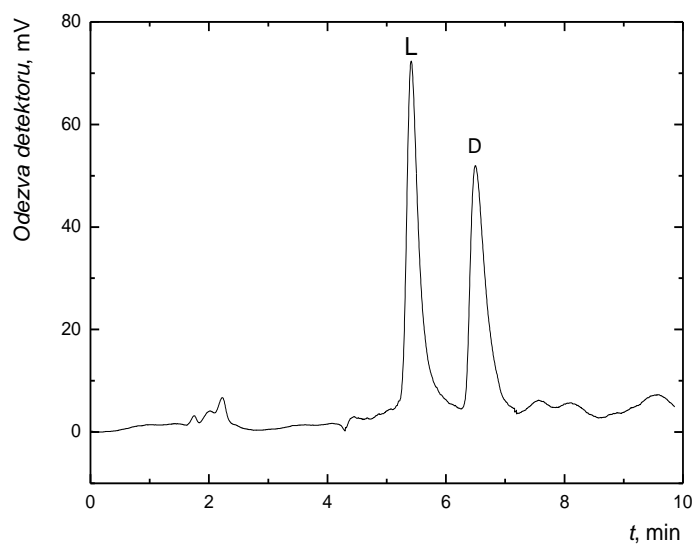
Pro separaci D,L-valinu byla na základě literárních údajů zvolena kolona CHIROBIOTIC T - teikoplanin navázaný na silikagelu a detekce při $\lambda=205$ nm.^{8,26} Standard racemátu valinu byl rozpuštěn ve směsi methanol/voda 50/50 (v/v) o výsledné koncentraci 1 mg/ml.

Jako mobilní fáze byla použita směs methanol/voda a byl sledován vliv obsahu MeOH v mobilní fázi v rozsahu 40 - 70 (v/v) na hodnoty retenčních faktorů obou enantiomerů, enantioselektivitu, enantiorozlišení a plochu a výšku píků obou enantiomerů. Výsledky jsou uvedeny v tab. 1. Z té je patrné, že již při použití mobilní fáze s nejnižším proměřovaným obsahem methanolu (40 obj. %) došlo k enantiorozlišení obou enantiomerů až na základní linii, avšak eluce byla velmi rychlá. Zejména dříve eluující enantiomer eluoval velmi blízko mrtvého času. Se vzrůstajícím obsahem methanolu v mobilní fázi docházelo k prodlužování retence obou enantiomerů a ke zvyšování enantioselektivity a enantiorozlišení. Separační chování valinu na teikoplaninové stacionární fázi v mobilní fázi methanol/voda s obsahem metanolu, který byl vyšší než 50 obj. % odpovídá tzv. HILIC (hydrofilní interakční chromatografie) módu, kdy se vzrůstajícím obsahem organického modifikátoru dochází k prodlužování retence analytu. V případě parametrů pro kvantitativní analýzu (velikost plochy a výšky píků) se jako nejvhodnější jevila mobilní fáze o složení 50/50 (v/v) methanol/voda, ve které sledované parametry dosahovaly maxima, vzhledem k nejlepší dosažené symetrii píků. Ve všech testovaných mobilních fázích eluoval jako první L-enantiomer, což bylo potvrzeno nástřikem roztoku, připraveného rozpuštěním 1 mg standardu L-valinu v 1 ml směsi MeOH/voda v poměru 1 : 1. Pro kvantifikaci obou enantiomerů valinu byla jako optimální zvolena mobilní fáze o složení methanol/voda 50/50 (v/v). Pro ilustraci je na obr. 7 ukázána enantioseparace D,L-valinu v optimalizovaných separačních podmínkách. Z obrázku je patrné, že doba analýzy nepřesahuje 8 min., píky jsou dobře oddělené a jejich symetrie je uspokojivá zejména pro D-enantiomer. Zhoršený průběh základní linie (určitou absorbanci vykazují i ostatní složky mobilní fáze) souvisí s UV detekcí při 205 nm. Molekula valinu neobsahuje

žádné chromofory, a tak pokud je molekula valinu detekována v nederivatizované formě, je k dosažení alespoň nějaké citlivosti UV detekce nutná tato nízká vlnová délka.

Tab. 1 Vliv změny složení mobilní fáze na vybrané separační a kvantifikační parametry, kde k_1 je retenční faktor L-valinu, k_2 je retenční faktor D-valinu, $\alpha_{1/2}$ je enantioselektivita a $R_{1,2}$ je enantiorozlišení, A_1 je plocha L-valinu, A_2 je plocha D-valinu, h_1 je výška L-valinu, h_2 je výška D-valinu; experimentální podmínky: UV detekce, $\lambda = 205$ nm, $Q = 0,7$ ml/min

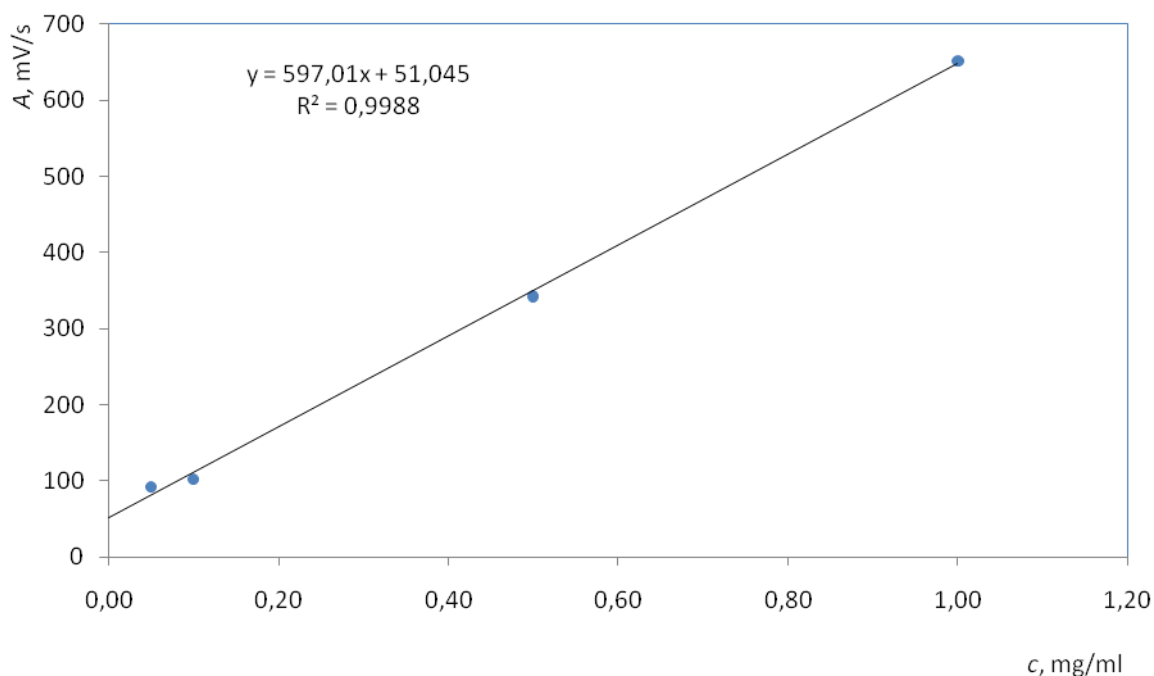
MeOH/H ₂ O (%)	A_1 (mV/s)	A_2 (mV/s)	h_1 (mV)	h_2 (mV)	k_1	k_2	$\alpha_{1/2}$	$R_{1,2}$
40/60	682	775	51,5	46,1	1,26	1,55	1,23	1,73
50/50	913	808	66,3	46,6	1,41	1,89	1,34	2,63
60/40	741	803	47,5	35,1	1,53	2,20	1,44	2,98
70/30	690	551	40,0	24,4	1,76	2,70	1,53	3,60



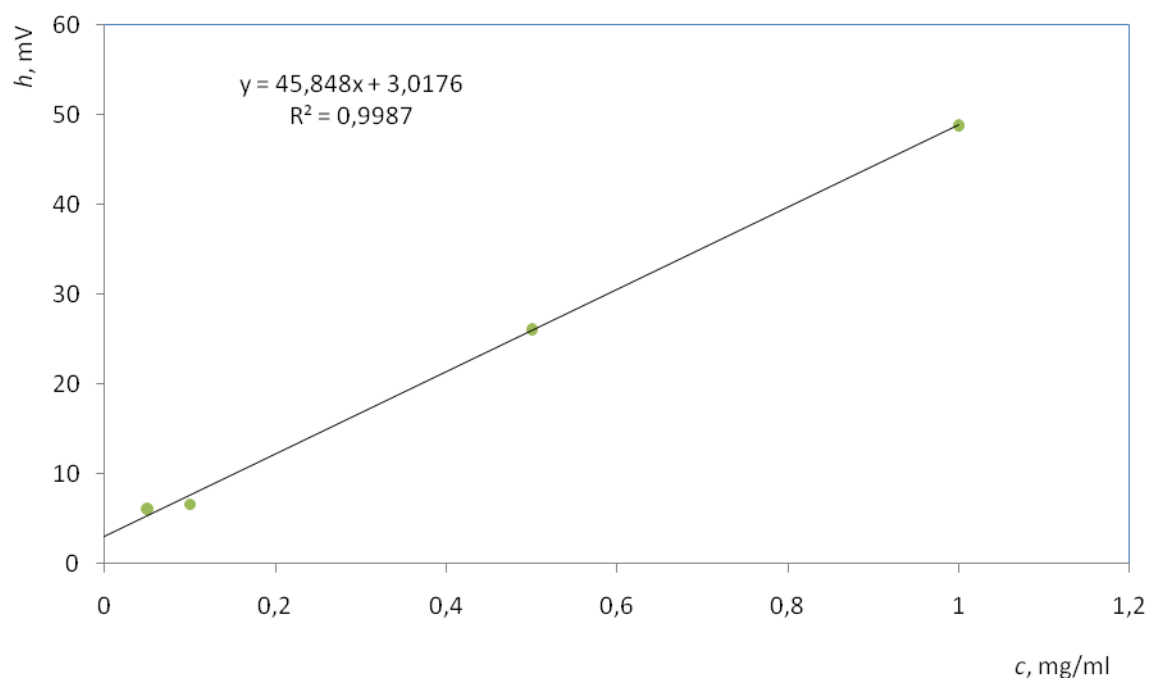
Obr. 7 Separace D,L-valinu v mobilní fázi MeOH/H₂O v poměru 50/50 (v/v), UV detekce při 205 nm, kde L je označení pro pík L-valinu a D je označení pro pík D-valinu

4.2 Kalibrační závislost

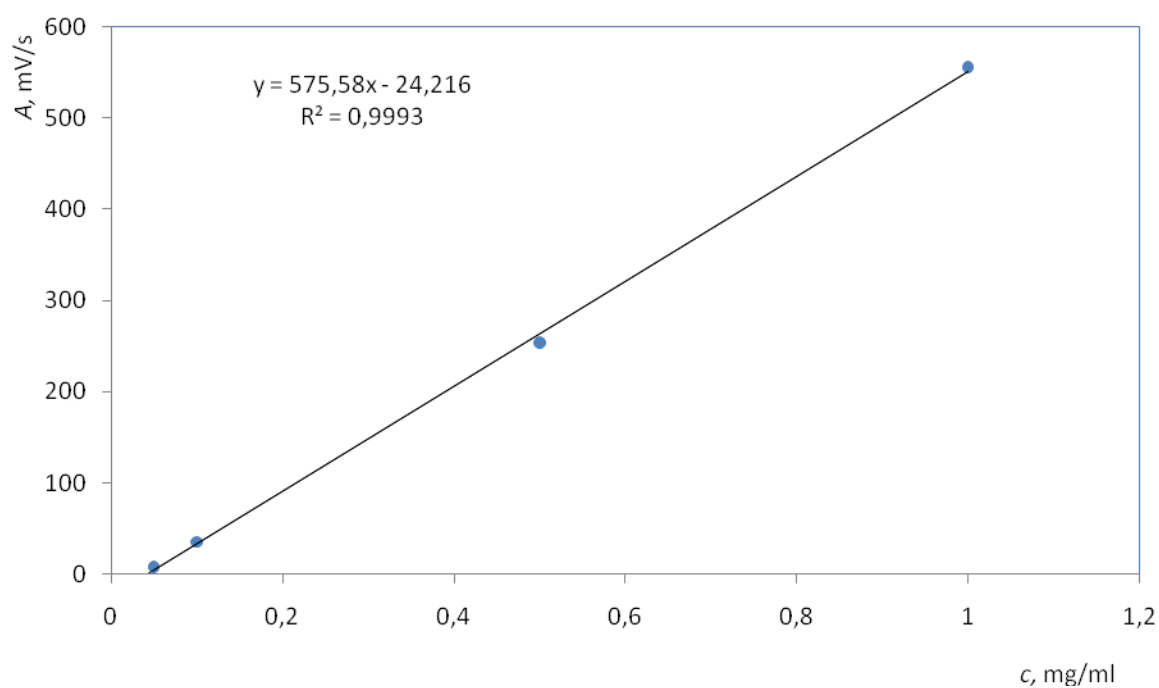
Za optimalizovaných separačních podmínek (mobilní fáze MeOH/H₂O v poměru 50/50 (v/v), UV detekce při 205 nm, Q = 0,7 ml/min) byla proměřena závislost ploch píků obou enantiomerů (viz obr. 8 a 10) a výšek píků obou enantiomerů (viz obr. 9 a 11) na koncentraci v rozsahu 0,05 - 1 mg/ml D,L-valinu. Každá koncentrace byla proměřena třikrát ($n = 3$) a v kalibračních závislostech je vyneseno medián příslušných veličin. Kalibrační závislosti byly zpracovány pomocí lineární regrese a v grafech jsou uvedeny regresní rovnice a koeficienty determinace (R^2) pro danou závislost.



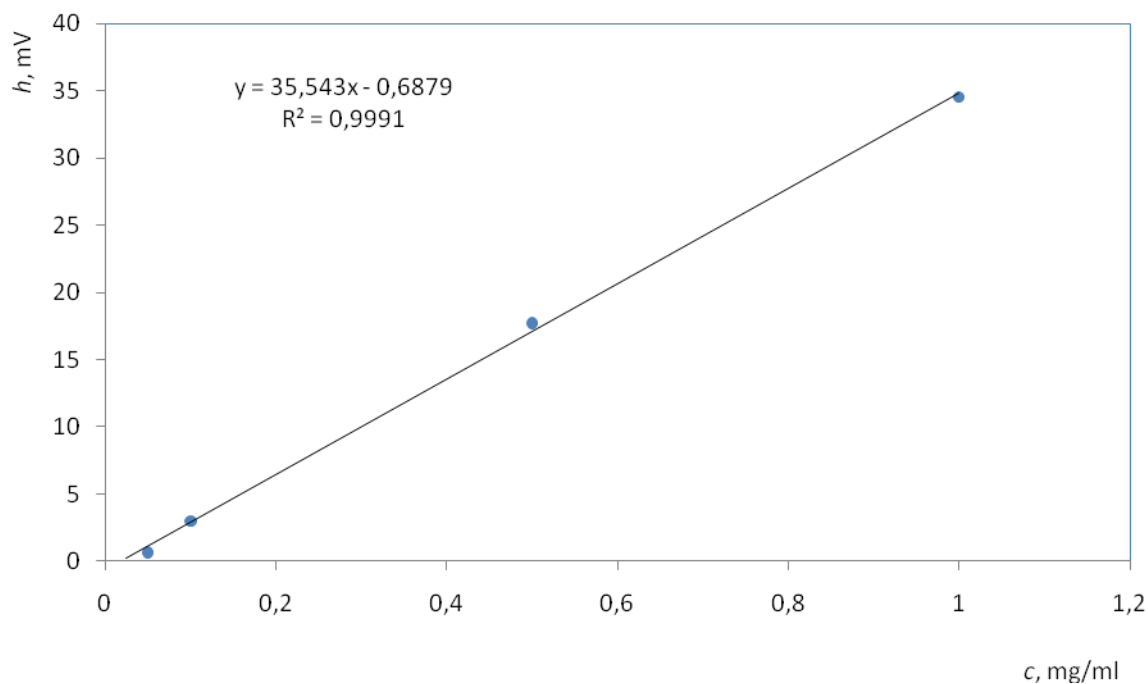
Obr. 8 Kalibrační křivka L-valinu vyhodnocená z ploch píků



Obr. 9 Kalibrační křivka L-valinu vyhodnocená z výšek píků



Obr. 10 Kalibrační křivka D-valinu vyhodnocená z ploch píků



Obr. 11 Kalibrační křivka D-valinu vyhodnocená z výšek píků

Ze získaných výsledků je patrné, že vyššího koeficientu determinace bylo dosaženo pro D-enantiomer jak v případě vyhodnocení ploch, tak výšek. Ve všech případech nebylo dosaženo nulové hodnoty úseku, což je pravděpodobně způsobeno nenulovou absorbancí pozadí, jak o tom bylo napsáno již dříve.

4.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) je nejnižší množství stanovované látky ve vzorku, které může být danou analytickou metodou spolehlivě detekováno. Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší množství stanovované látky ve vzorku, které může být danou analytickou metodou kvantitativě stanoveno s přijatelným stupněm přesnosti. Pro určení LOD a LOQ byly použity regresní rovnice získané ze závislosti výšky píků D- a L-enantiomerů na koncentraci jako trojnásobek, respektive desetinásobek hodnoty šumu. Výsledky jsou uvedeny v tab 2. Při výpočtech limitů detekce a stanovitelnosti byly hodnoty úseků zanedbány.

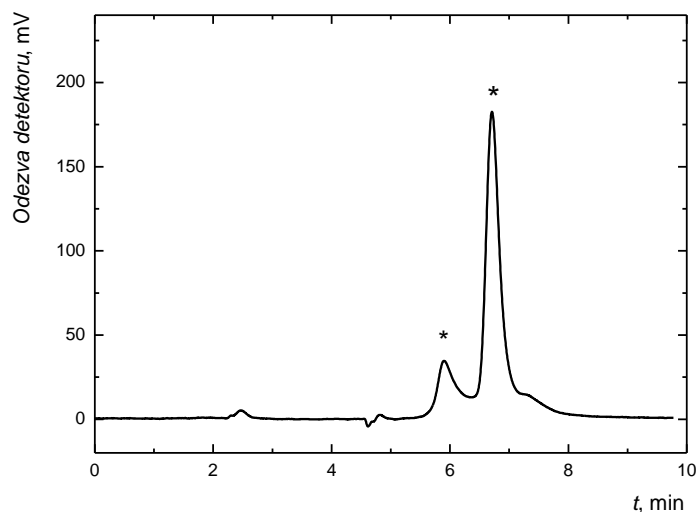
Tab. 2 Hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé enantiomery, mobilní fáze MeOH/H₂O v poměru 50/50 (v/v); experimentální podmínky: UV detekce při 205 nm, Q = 0,7 ml/min

enantiomer	LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)
L-valin	$4,33 \cdot 10^{-3}$	$1,44 \cdot 10^{-2}$
D-valin	$5,58 \cdot 10^{-3}$	$1,86 \cdot 10^{-2}$

4.4 Volba složení mobilní fáze pro enantioseparaci derivatizovaného Fmoc-D,L- valinu

Většina AMK v UV oblasti vykazuje nízkou absorbanci a nativní aminokyseliny nevykazují přirozenou fluorescenci. Pokud je nutné zvýšit citlivost jejich detekce, je nutné je derivatizovat. Pro derivatizaci valinu byl vybráno derivatizační činidlo 9-fluorenylmethylchlormravenčan (Fmoc-Cl) díky tomu, že derivatizační reakce by měla být dostatečně rychlá, jeho deriváty s aminokyselinami vykazují fluorescenci a lze je detekovat i v UV oblasti s podstatně větší citlivostí než v případě nederivatizovaných aminokyselin (zejména neobsahujících chromofor). V literatuře je doporučován dostatečný nadbytek derivatizačního činidla vzhledem k aminokyselině.²⁴ Nejprve byla provedena derivatizace D,L-valinu. Byl připraven zásobní roztok Fmoc-Cl v acetonitrilu o koncentraci 1mg/ml. Roztok derivatizačního činidla byl smíchán s roztokem D,L-valinu ($c = 1 \text{ mg/ml}$) v poměru 4/1. Derivatizační reakce byla provedena za laboratorní teploty po dobu 20 min.

Pro derivatizovaný D,L-valin byla hledána vhodná separační soustava. Jako první byla používána UV detekce při 262 nm.²⁴ Opět byla studována mobilní fáze MeOH/H₂O a byl sledován vliv obsahu MeOH v mobilní fázi na retenci Fmoc-D,L-valinu v rozsahu 30-70 obj. %. Volba tohoto složení mobilní fáze se ukázala jako nevhodná, protože ve všech proměřovaných mobilních fázích byla retence obou derivatizovaných enantiomerů velice krátká a srovnatelná s mrtvým časem. Samotné derivatizační činidlo, kterého je v separované směsi nadbytek, vykazovalo vyšší retenci a poskytovalo dva píky, jak je dokumentováno na obr. 12.



Obr. 12 Separace samotného FMOC-Cl v mobilní fázi MeOH/H₂O v poměru 50/50 (v/v) za použití UV detekce při 262 nm, * je označení pro složky z FMOCu

Pro zlepšení separace byla deionizovaná voda vyměněna za 0,5% triethylaminooctanový (TEAA) pufr (2,5 ml trimethylaminu do výsledného objemu 500 ml vody), jehož pH bylo upraveno na hodnotu 3,5 a 4,0 přidávkem octové kyseliny. Vzhledem k velmi nízkým retencím, dosahovaným v mobilní fázi methanol/voda, činil nejvyšší proměřovaný obsah methanolu v mobilní fázi 50 obj. % a opět byl sledován vliv obsahu methanolu (30 - 50 obj. %) v mobilní fázi methanol/0,5% TEAA pufr o pH 3,5 a 4,0 na vybrané separační parametry obou derivatizovaných enantiomerů. Výsledky jsou uvedeny v tab. 3.

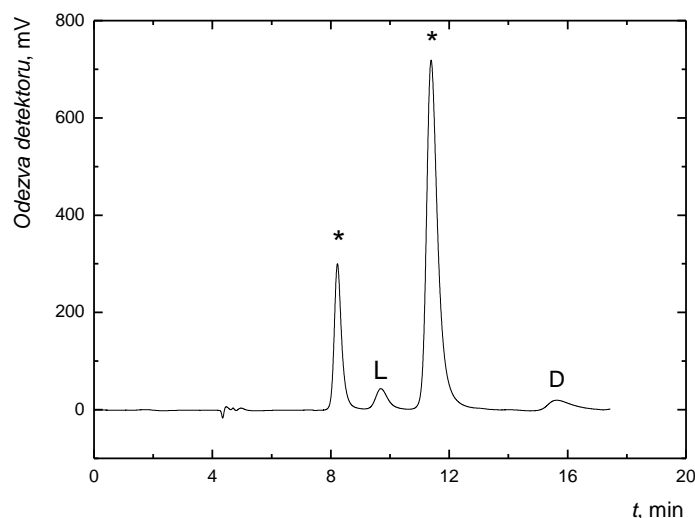
Tab. 3 Vliv obsahu methanolu a hodnoty pH TEAA pufru v mobilní fázi na vybrané separační parametry, kde k_1 je retenční faktor FMOC-L-valinu, k_2 je retenční faktor FMOC-D-valinu, $\alpha_{1/2}$ je enantioselektivita a $R_{1,2}$ je enantiorozlišení; experimentální podmínky: UV detekce, $\lambda = 262$ nm, $Q = 0,7$ ml/min

MeOH/0,5% TEAA pufr (v/v)	pH pufru	k_1	k_2	$\alpha_{1/2}$	$R_{1,2}$
50/50	3,5	1,58	2,05	1,30	5,445
	4,0	1,47	2,39	1,63	5,589
40/60	3,5	2,74	3,68	1,34	3,357
	4,0	2,66	4,77	1,79	6,132
30/70	3,5	*	6,91	-	-
	4,0	5,20	9,88	1,90	5,437

* koeluze L-enantiomeru s prvním píkem FMOC-Cl

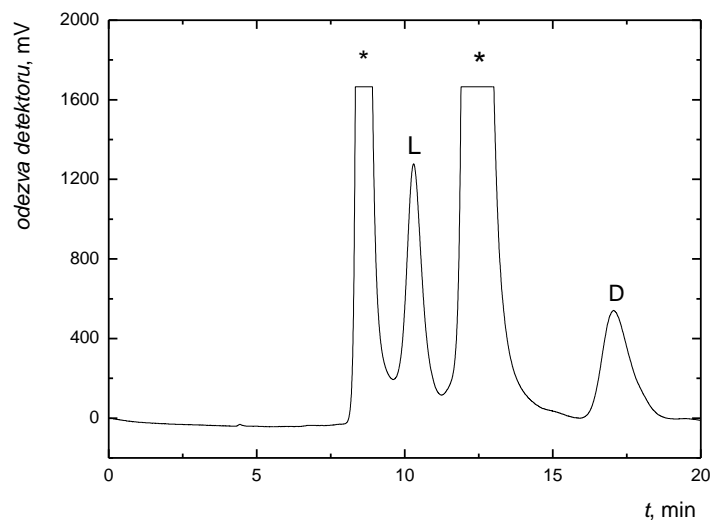
Záměna vody za 0,5% TEAA pufr přinesla prodloužení retence obou derivatizovaných enantiomerů, avšak zároveň i větší či menší koeluci derivatizovaných enantiomerů se složkami nezreagovaného nadbytku derivatizačního činidla (viz obr. 12). Obecně lze říci, že se snižujícím se obsahem methanolu v mobilní fázi docházelo k prodlužování retence obou derivatizovaných enantiomerů, která byla výraznější v případě D-formy. Vliv pH neměl takto jednoznačný trend, ale v rámci mobilní fáze o daném obsahu methanolu docházelo při vyšší hodnotě pH (4,0) ke zrychlení eluce L-formy a naopak zpomalení D-formy. Ani v jedné z mobilních fází uvedených v tab. 3 nedošlo k uspokojivému oddělení L-formy od obou píků derivatizačního činidla na jedné straně a k ne příliš dlouhé eluci D-formy. Kvůli jemnějšímu nastavení retence byla ještě vyzkoušena „mezifáze“ o složení 37/63 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH = 4,0. V této mobilní fázi došlo k separaci obou

derivatizovaných enantiomerů od složek derivatizačního činidla a retence Fmoc-D-valinu nepřesáhla 20 minut. Výsledná separace je uvedena na obr. 13.

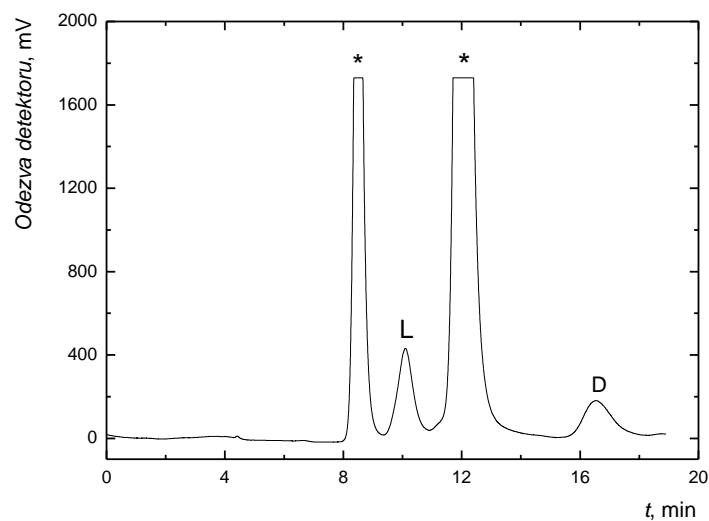


Obr. 13 Separace Fmoc-D,L-valinu v mobilní fázi 37/63 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH = 4,0 kde L je označení pro pík Fmoc-L-valinu, D je označení pro pík Fmoc-D-valinu, a * jsou označeny píky, příslušející nezreagovanému Fmoc-Cl; UV detekce při 262 nm, Q = 0,7 ml/min.

Z obrázku je patrné, že po derivatizaci došlo k podstatnému zvýšení citlivosti UV detekce (obr. 7 vs obr. 13). Při stejném složení mobilní fáze byla separace provedena i s fluorescenční detekcí. Vlnové délky excitace a emise byly vybrány na základě proměření příslušných excitačních a emisních spekter a byly určeny jako $\lambda_{\text{excit}} = 254 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{emis}} = 314 \text{ nm}$. Separace za podmínek fluorescenční detekce je uvedena na obr. 14. Z porovnání obou obrázků (obr. 13 vs 14) je patrné, že při fluorescenční detekci bylo dosaženo mnohonásobně vyšší citlivosti detekce. Na obr. 15 je uvedena separace Fmoc-D,L-valinu 20 x zředěného (oproti koncentraci na obr. 14), kde je vidět, že oba derivatizované enantiomery jsou lépe separovány od nadbytku derivatizačního činidla.



Obr. 14 Separace Fmoc-D,L-valinu v mobilní fázi 37/63 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr pH=4,0 za použití fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, Q = 0,7 ml/min; označení píků je stejné jako na obr. 13



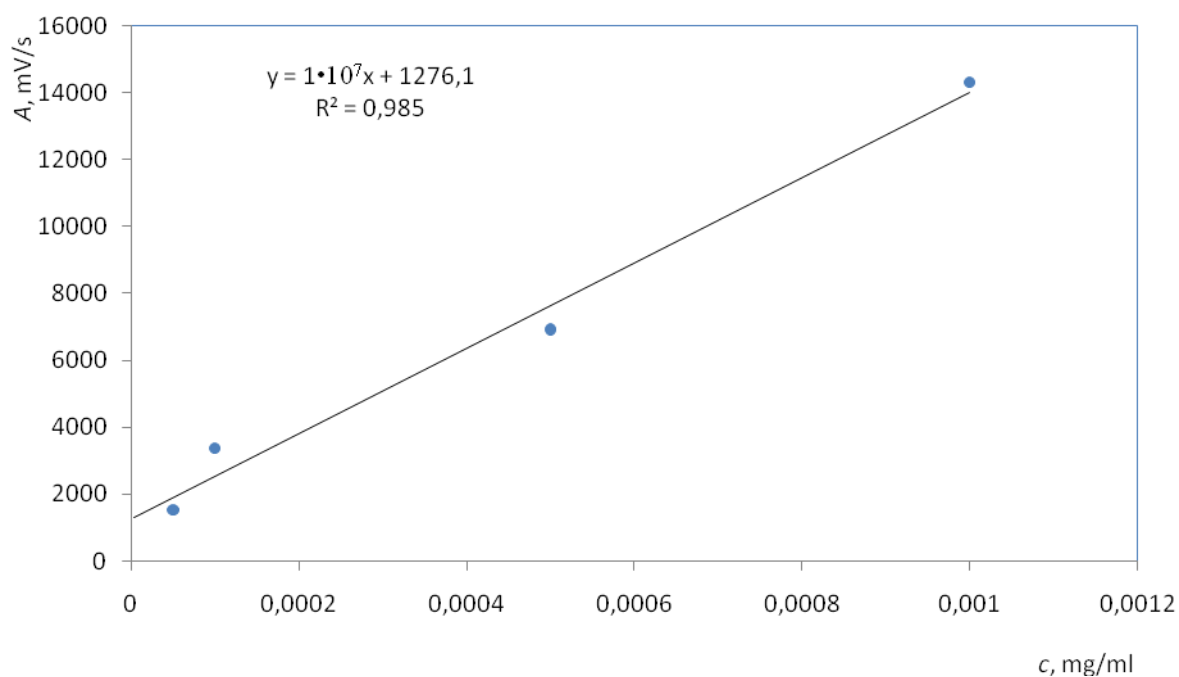
Obr. 15 Separace 20 x zředěného Fmoc-D,L-valinu za stejných experimentálních podmínek jako na obr. 14; označení stejné jako na obr. 13.

Dále byla proměřena kalibrační závislost ploch a výšek píků Fmoc-L- a Fmoc-D- valinu na koncentraci Fmoc-L,D-valinu v rozsahu $5 \cdot 10^{-5}$ - 0,01 mg/ml.

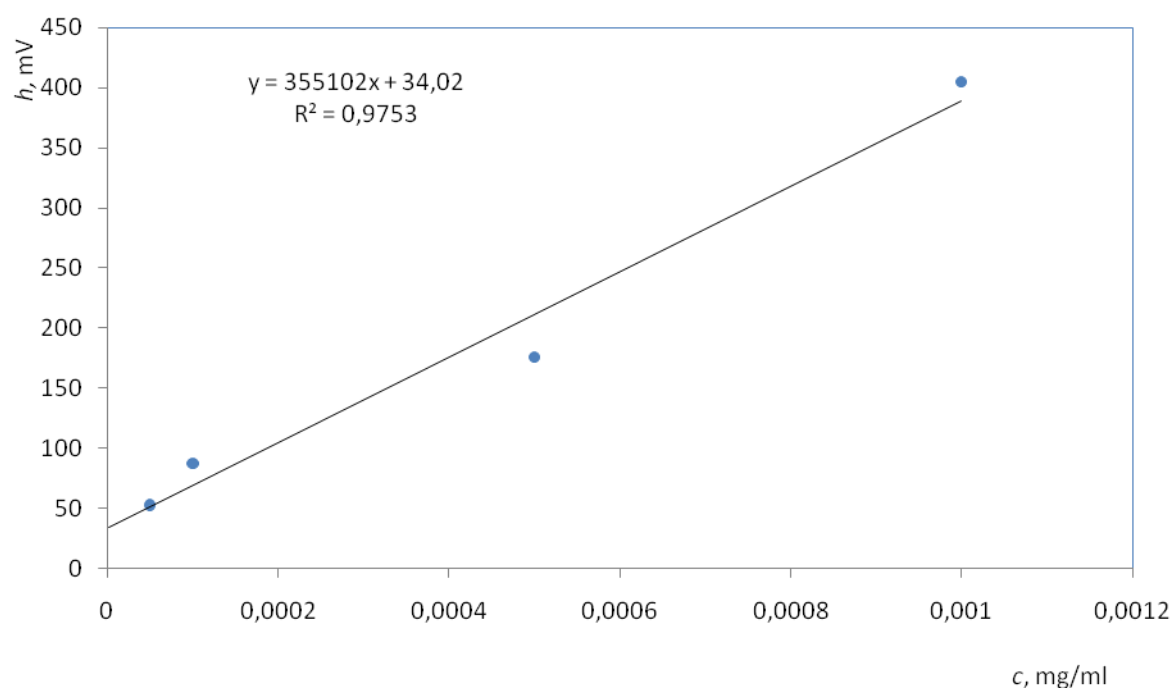
4.5 Kalibrační závislost

V mobilní fázi o složení 37/63 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 4,0 za použití fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm byly proměřeny závislosti ploch (viz obr. 15 a 17) a výšek píků (viz obr. 16 a 19) obou derivatizovaných enantiomerů na koncentraci FMOC-D,L-valinu v koncentračním rozsahu ($5 \cdot 10^{-5}$ - 0,01 mg/ml). Při nejvyšších proměřovaných koncentracích FMOC-D,L-valinu (0,01 a 0,005 mg/ml) však signál odpovídající FMOC-L-valinu přesahoval rozsah detektoru a nebylo jej možno vyhodnotit. V kalibračních závislostech pro FMOC-L-valin je proto jako nejvyšší proměřovaná koncentrace uvedena 0,001 mg/ml.

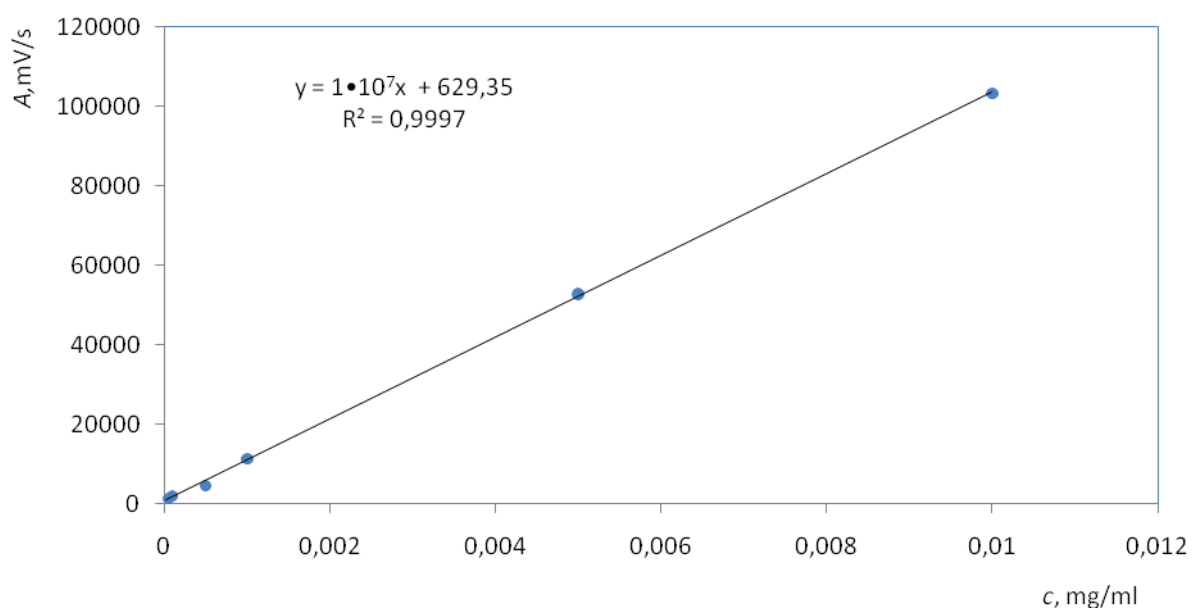
Měření pro každou koncentrační hladinu bylo provedeno třikrát a v kalibračních závislostech je uveden medián příslušných veličin. Kalibrační závislosti byly opět podrobeny regresní analýze a příslušné regresní rovnice a koeficienty determinace jsou uvedeny v rámci jednotlivých grafů. Opět jako v případě kvantifikace s UV detekcí byly lepší koeficienty determinace získány pro D-formu. Hodnoty úseků v regresních rovnicích pro závislost ploch i výšek píků na koncentraci jsou v případě D-formy velmi malé. Podstatně vyšší hodnoty úseků pro L-formu pravděpodobně souvisejí s podstatně horší separací této formy od derivatizačního činidla, které je ve směsi ve velkém nadbytku.



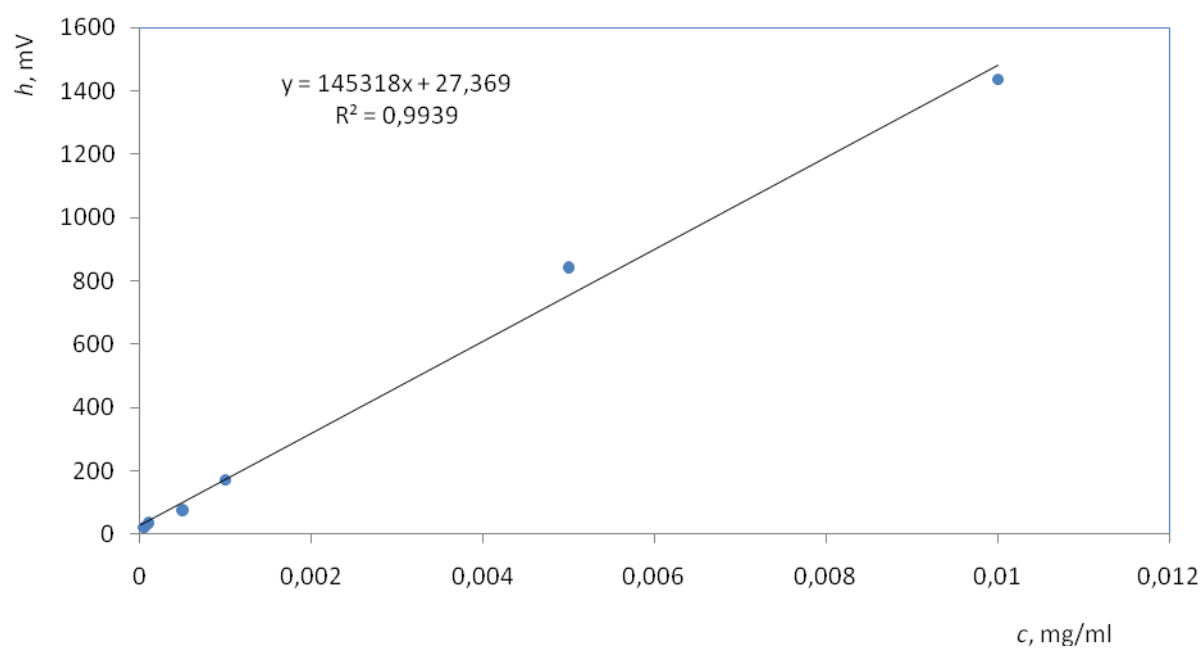
Obr. 16 Kalibrační křivka L-valinu vyhodnocená z ploch píků



Obr. 17 Kalibrační křivka L-valinu vyhodnocená z výšek píků



Obr. 18 Kalibrační křivka D-valinu vyhodnocená z ploch píků



Obr. 19 Kalibrační křivka D-valinu vyhodnocená z výšek píků

4.6 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Meze detekce a stanovitelnosti byly určeny analogicky, jako v případě UV detekce a jsou uvedeny v tab. 4.

Tab. 4 Hodnoty meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé enantiomery, mobilní fáze 37/63 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 4,0 za použití fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm

enantiomer	LOD (mg/ml)	LOQ (mg/ml)
Fmoc-L-valin	$2,17 \cdot 10^{-5}$	$7,23 \cdot 10^{-5}$
Fmoc-D-valin	$5,30 \cdot 10^{-5}$	$1,77 \cdot 10^{-4}$

Při porovnání tab. 2 a 4 je zřejmé, že derivatizací D,L-valinu, umožňující fluorescenční detekci, bylo dosaženo podstatně vyšší citlivosti detekce a to je důležité zejména pro D-formu aminokyseliny, která se ve většině analýz vyskytuje jako minoritní složka.

5. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo nalezení vhodných podmínek pro enantioseparaci a detekci D,L-valinu metodou RP-HPLC a určení limitu detekce a limitu stanovení nederivatizovaných a derivatizovaných enantiomerů valinu.

Jako stacionární fáze byla vybrána kolona CHIROBIOTIC T s teikoplaninem navázaným na silikagelu a pro separaci nederivatizovaného D,L-valinu byla zvolena vlnová délka UV detekce 205 nm. Vhodné separace valinu bylo docíleno postupnými změnami složení mobilní fáze. Nejdříve byla testována mobilní fáze MeOH/H₂O v různých procentuálních poměrech. Bylo zjištěno, že mobilní fáze, ve které byl methanol v nadbytku oproti vodě, nemá příznivý vliv na retenční čas analytu. Po nalezení optimálního poměru (50/50 (v/v)) byla proměřena kalibrační závislost ploch a výšek pík obou enantiomerů na koncentraci analytu. Kalibrační závislosti byly podrobeny regresní analýze a byly určeny mez detekce ($4,33 \cdot 10^{-3}$ mg/ml) a mez stanovitelnosti ($1,4 \cdot 10^{-2}$ mg/ml) pro L-valin a analogicky mez detekce ($2,49 \cdot 10^{-2}$ mg/ml) a mez stanovitelnosti ($3,8 \cdot 10^{-2}$ mg/ml) pro D-valin. Pro zvýšení citlivosti detekce byl racemát valinu derivatizován pomocí 9-fluorenylmethylchlormravenčanu (FMOC-Cl) a vlnová délka UV detekce byla nastavena na 262 nm. Při proměřování mobilní fáze MeOH/H₂O v rozsahu 70-30 obj. % methanolu byla retence velmi rychlá. Výměna vody za 0,5% triethylaminooctanový pufr v mobilní fázi vedla k lepšímu rozdělení všech pík. Podmínky separace byly proměřeny v několika různých objemových poměrech mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr při dvou hodnotách pH pufru (3,5 a 4,0). Jako nejvhodnější se jevila mobilní fáze o složení 37/63 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 4,0, která se stala základem pro kvantifikační měření s fluorescenční detekcí a byla opět určena mez detekce ($2,17 \cdot 10^{-5}$ mg/ml) a mez stanovitelnosti ($7,23 \cdot 10^{-5}$ mg/ml) pro FMOC-L-valin a mez detekce ($5,30 \cdot 10^{-5}$ mg/ml) a mez stanovitelnosti ($1,77 \cdot 10^{-4}$ mg/ml) pro FMOC-D-valin. Porovnáním dosažených limitů bylo zjištěno, že derivatizací bylo s fluorimetrickou detekcí dosaženo přibližně o dva řády vyšší citlivosti.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Ekborg-Ott, K.H.; Armstrong, D.W.: *Chiral separations, applications and technology*. Washington, American Chemical Society 1997.
2. Alberts, B.; Bray, D.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.: *Základy buněčné biochemie*. Ústí nad Labem, Espero publishing 1998.
3. Ilisz, I.; Berkecz, R.; Péter, A.: Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47, 1-15 (2008).
4. Klouda, P.: *Základy biochemie*. Ostrava, nakladatelství Pavel Klouda 2005.
5. Voet, D.; Voetová, J.G.: *Biochemie*. Praha, Victoria publishing 1995.
6. Li, Y.H.; Lee, W.: Liquid chromatographic enantiomer resolution of *N*-fluorenylmethoxycarbonyl α -amino acids and their ester derivatives on polysaccharide-derived chiral stationary phases. *J. Sep. Sci.* 28, 2057-2060 (2005).
7. Pacák, J.: *Poznáváme organickou chemii*. Praha, nakladatelství Technické literatury 1989.
8. Novotný, M.; Riekkola, M.L.; Soini, H.: Chiral separations of basic drugs and quantitation of bupivacaine enantiomers in serum by capillary electrophoresis with modified cyclodextrin buffers. *J. Chromatogr.* 608, 265-274 (1992).
9. Štulík, K. a kolektiv: *Analytické separační metody*. Praha, Univerzita Karlova, Karolinum 2005.
10. Hartl, J.; Doležal, M.; Miletín, M.; Opletalová, V.; Zimčík, P.: *Farmaceutická chemie IV*. Praha, Univerzita Karlova, Karolinum 2008.
11. Gasper, M.P.; Berthold, A.; Nair, U.B.; Armstrong, D.W.: Comparison and modeling study of vancomycin, ristocetin A, and teicoplanin for CE enantioseparations. *Anal. Chem.* 68, 2501-2514 (1996).
12. *Handbook Chirobiotic*TM. USA, Advanced Separation Technology, Astec 2004.
13. Desiderio, C.; Fanali, S.: Review: Chiral analysis by capillary electrophoresis using antibiotics as chiral selektor. *J. Chromatogr. A* 807, 37-56 (1993).

14. Bhushan, R.; Kumar, R.: Analysis of multicomponent mixture and simultaneous enantioresolution of proteinogenic and non-proteinogenic amino acids by reserved-phase high-performance liquid chromatography using chiral variant of Sanger's reagent. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1697-1705 (2009).
15. Husman, R.; Kumar, V.: Indirect enantioseparation of α -amino acids by reserved-phase liquid chromatography using new chiral derivatizing reagents synthesized from s-triazine chloride. *J. Chromatogr. A* 1201, 35-42 (2008).
16. Guranda, D.T.; Chernobrovkin, M.G.; Kudryavtsev, P.A.; Shapovalova, E.N.; Shpigun, O.A.; Švedas, V.K.: Chiral high-performance liquid chromatography analysis of α -amino acid mixtures using a novel SH reagent – N-(*R*)-mandelyl-L-cysteine and traditional enantiomeric thiols for precolumn derivatization. *J. Chromatogr. A* 1175, 89-95 (2007).
17. Fujita, Y.; Nomura, M.; Oguri, S.: A new strategy for the selective determination of D-amino acids; enzymatic and chemical modification for pre-column derivatization. *J. Chromatogr. A* 1078, 51-58 (2005).
18. Chen, S.: The facile HPLC enantioresolution of amino acids, peptides on naphthylethylcarbamate- β -cyclodextrin bonded phases derivatization with phenyl isothiocyanate: factors that affect the resolution. *Amino Acids* 26, 291-298 (2004).
19. Chen, S.: HPLC enantiomeric resolution of phenyl isothiocyanated amino acids on teicoplanin-bonded phase using an acetonitrile-based mobile phase: A structural consideration. *J. Liq. Chromatogr. Technol.* 26, 3475-3495 (2003).
20. Fitznar, H. P.; Kattner, G.; Lobbes, J. M.: Determination of enantiomeric amino acids with high-performance liquid chromatography and precolumn derivatisation with *o*-phthaldialdehyde and *N*-isobutyrylcysteine in seawater and fossil samples. *J. Chromatogr. A* 832, 123-132 (1999).
21. Itoh, E.; Meguro, H.; Nishida, Y.; Ohnui, H.; Togashi, Y.: Simultaneous analysis of enantiomeric amino acids based on derivatization with (*S*)-(+)-2-*t*-butyl-2-methyl-1,3-benzodioxole-4-carboxylic acid and high-performance liquid chromatography. *Anal. Sci.* 12, 551-555 (1996).

22. Jegorov, A.; Trnka, T.; Tříska, J.: 1-thio- β -D-galactose as a chiral derivatization agent for the resolution of D,L-amino acid enantiomers. *J. Chromatogr. A* 673, 286-290 (1994).
23. Gripon, J.C.; Le Bars, D.; Roturier, J.M.: Separation and identification of hydrophilic peptides in dairy products using Fmoc derivatization. *J. Chromatogr. A* 696, 209-217 (1995).
24. Jámboř, A.; Molnár-Perl, I.: Literature overview and further study: Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. *J. Chromatogr. A* 1216, 3064–3077 (2009).
25. Pacáková, V.; Štulík, K.: *High performance liquid chromatography*. Praha, Univerzita Karlova, Státní pedagogické nakladatelství 1990.
26. Frahm, A.W.; Schlauch, M.: Enantiomeric and diastereoizomeric high-performance liquid chromatographic separation of cyclic β -substituted α -amino acids on a teicoplanin chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* 868, 197-207 (2000).